

PARTIAL TRANSLATION OF JP 2001-147374 A

Publication Date: May 29, 2001

Patent Application Number: 11(1999)-328031

Filing Date: November 18, 1999

Inventor: Katsuhiko AJITO and Masao MORITA

Applicant: NIPPON TELEGR & TELEPH CORP

[Title of the Invention] METHOD AND DEVICE FOR ACQUIRING
THREE-DIMENSIONAL IMAGE

[Claims]

1. A method for acquiring a three-dimensional image comprising:
trapping a micro-sample by a laser beam for light trap;
scanning the micro-sample by a laser beam for spectrochemical
analysis; and
acquiring a three-dimensional image of the micro-sample.
2. A method for acquiring a three-dimensional image comprising:
trapping a micro-sample by a laser beam for light trap;
scanning the micro-sample by the laser beam for light trap in a focal
portion of a laser beam for spectrochemical analysis; and
acquiring a three-dimensional image of the micro-sample.
3. The method according to claim 1 or 2, wherein a wavelength
difference between the laser beam for spectrochemical analysis and the laser
beam for light trap is not less than 10 nm.
4. A device for acquiring a three-dimensional image comprising:
a light trap light source generating a laser beam for light trap;
a spectrochemical analysis light source generating a laser beam for
spectrochemical analysis;
a sample holding means for holding a micro-sample movably in
three-dimensional directions;
a scanning means for scanning/moving a focal position of the laser
beam for light trap or the laser beam for spectrochemical analysis
three-dimensionally; and

an analyzing means for receiving reflected light or scattered light from the micro-sample and acquiring a three-dimensional image by fluorescence or Raman scattering.

5. The device according to claim 4, wherein a wavelength difference between the laser beam for spectrochemical analysis and the laser beam for light trap is not less than 10 nm.

(Page 2, column 2, lines 31-35)

[0007]

It is an object of the present invention to provide a method and a device that can fix a micro-sample having a diameter of not more than several tens of microns or a biological sample such as a cell easily without damaging them and acquire a precise three-dimensional image of the inside of the samples.

(Page 3, column 4, lines 15-30)

[0017]

Embodiment 1

FIG. 1 shows Embodiment 1 of the present invention. In FIG. 1, reference numeral 1 is a light trap light source, 2 is a beam expander, 3 is a laser line filter, 4 is a reflective mirror, 5 is a galvanometer mirror, 6 is an objective lens, 7 is an adjustable mount, 8 is a cell, 9 is a solution, 10 is a sample of fine particles, 11 is an analysis light source, 12 is a laser line filter, 13 is a beam expander, 14 and 15 are beam splitters, 16 is an objective lens, 17 is a visible light source, 18 is a condenser lens, 19 is a visible light transmission filter, 20 and 21 are photographic notch filters, 22 is a beam splitter, 23 is a television camera, 24 is a reflective mirror, 25 is a convergent lens, 26 is a pinhole, 27 is a condenser lens, 28 is a reflective mirror, 29 is an adjustable mount, 30 is a diffraction grating, 31 is a reflective mirror, 32 is a convergent lens, and 33 is a multi-channel detector.

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	P I	チマコード (参考)
G 0 2 B 21/00		G 0 2 B 21/00	2 F 0 6 5
G 0 1 N 1/02		G 0 1 N 1/02	M 2 G 0 4 3
21/64		21/64	E 2 G 0 4 5
21/65		21/65	2 H 0 5 2
// G 0 1 B 11/24		33/483	C

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-328031
(22) 出願日 平成11年11月18日 (1999. 11. 18)

(71) 出願人 000004226
日本電信電話株式会社
東京都千代田区大手町二丁目3番1号
(72) 発明者 味戸 克裕
東京都千代田区大手町二丁目3番1号 日
本電信電話株式会社内
(73) 発明者 森田 雅夫
東京都千代田区大手町二丁目3番1号 日
本電信電話株式会社内
(74) 代理人 100069981
弁理士 吉田 精幸

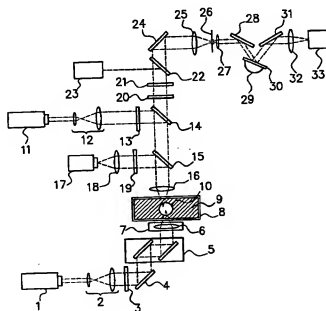
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3次元イメージ取得方法及びその装置

(57) 【要約】

【課題】 直径数10ミクロン以下の微小試料や細胞等の生体試料を容易にかつ損傷させることなく固定でき、これらの内部の正確な3次元イメージを取得できる方法及びその装置を提供すること。

【解決手段】 光トラップ用光源1から発生し、対物レンズ6で収束された光トラップ用レーザー光の焦点位置を、ガルバノミラー5及び調整可能マウント7により3次的に走査させ、該光トラップ用レーザー光でトラップされた試料10をセル8の溶液9中で3次的に移動させることにより、分析用光源11から発生し、対物レンズ16で収束された分析用レーザー光の焦点位置に対して試料10を3次的に移動可能とし、これによって試料10から蛍光やラマン散乱光による3次元イメージを得る。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 光トラップ用レーザー光で微小試料をトラップし、分光分析用レーザー光を走査させて該微小試料の3次元イメージを得ることを特徴とする3次元イメージ取得方法。

【請求項2】 分光分析用レーザー光の焦点部で、微小試料をトラップした光トラップ用レーザー光を走査させて該微小試料の3次元イメージを得ることを特徴とする3次元イメージ取得方法。

【請求項3】 分光分析用レーザー光と光トラップ用レーザー光との波長差を10nm以上としたことを特徴とする請求項1または2記載の3次元イメージ取得方法。

【請求項4】 光トラップ用レーザー光を発生する光トラップ用光源と、
分光分析用レーザー光を発生する分光分析用光源と、
微小試料を3次元方向に移動自在に保持する試料保持手段と、

光トラップ用レーザー光もしくは分光分析用レーザー光の焦点位置を3次的に走査・移動する走査手段と、
微小試料からの反射光または散乱光を受光して蛍光やラマン散乱光による3次元イメージを得る分析手段とを備えたことを特徴とする3次元イメージ取得装置。

【請求項5】 分光分析用レーザー光と光トラップ用レーザー光との波長差を10nm以上としたことを特徴とする請求項4記載の3次元イメージ取得装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、高分子、ガラス、液滴、細胞等の微小試料を光学的にマニピレートして3次元イメージを得る方法及びその装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】共焦点レーザー顕微鏡（共焦点走査型レーザー顕微鏡ともいう。）あるいは顕微鏡ラマン分光装置は、高分子、ガラス、細胞等の微小（微粒子）試料の内部における蛍光やラマン散乱光の3次元イメージを得るために用いられている（例えば、蛍光の3次元イメージについては「新しい光学顕微鏡（第二巻）共焦点レーザー顕微鏡の医学・生物学への応用」、ラマン散乱光の3次元イメージについては「アナリティカルケミストリー」誌、第69巻、1997年、45頁～50頁、または「モレキュラークリスタル・アンド・リキッドクリスタル」誌、第314巻、1998年、191頁～196頁参照）。

【0003】これらの装置では、光学系に共焦点配置を用いている。共焦点配置とは、点光源（例えば、レーザー光源）と点検出器（例えば、ピンホールを装着した光検出器）とが共に試料内の一点に対して結像関係にある。このため、焦点面以外からの画像の寄与がなく、3次元試料中の特定の面だけの像、いわゆる断面像が得ら

れる。

【0004】具体的には、試料に光束（集光されたレーザー光）を照射しながら、試料または光束を走査させ、共焦点配置により焦点部からのみの反射光または散乱光について連続的に分光測定を行う。光束を固定して試料そのものを走査する方式をステージ走査型と呼び、試料は固定して光束の方を走査する方式を光束走査型と呼ぶ。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】前述したステージ走査型の場合はステージの移動範囲によって視野が決まるため、視野を広くすることが可能であり、また、光束が固定されているため、ピンホール位置に分光器の入射スリットを合わせることによって蛍光やラマン散乱光のスペクトルを得ることができる。しかし、生体試料等の溶液中にある試料等はステージ走査時に容易に動いてしまうため、試料を機械的（ガラス基板の間に挟む等）に、または接着剤（ポリリジン等）等で試料台に固定する必要があり、この場合、直径数10ミクロン以下の小さな試料に対してはその固定が困難である上、固定することによる試料の損傷が問題となっていた。

【0006】一方、光束走査型の場合は走査が速いのが特徴であるが、光束を走査するために共焦点配置のためのピンホール位置で光の揺らぎが生じ、このため、ピンホール径が1mm程度（分光器の入射スリットは10分の1以下）と非常に大きくなり、スペクトル分解能が悪くなって一度に同定できる分子の種類数が限定されてしまうという問題があった。また、ステージ走査型の場合程ではないにしろ、ある程度の試料固定が必要となるため、固定時における試料の損傷が問題となっていた。

【0007】本発明の目的は、直径数10ミクロン以下の微小試料や細胞等の生体試料を容易にかつ損傷させることなく固定でき、これらの内部の正確な3次元イメージを取得できる方法及びその装置を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明では、微粒子試料の固定に光トラップ（光ピンセットとも呼ぶ。）を利用する。この光トラップはレーザー光の光圧力によって微粒子を非接触・非破壊で捕獲する方法である。

【0009】レーザー光を用いた光圧力による微粒子捕獲の基本原理は、1970年にアシュキンによって示され（「フィジカル・レビュー・レター」誌、第24巻、1970年、156～159頁参照）、後に、アシュキンを含むグループによって高開口数の対物レンズを用いた簡便な方法が報告された（「オブティクス・レター」誌、第11巻、288～290頁参照）。これによって、対物レンズにより集光されたレーザーの焦点位置近傍に直径約20μmから20nmの微粒子を安定にトラップすることが可能になった。

【0010】また、この報告の中では可視域のレーザー光が使われていたが、代わりに近赤外域のレーザー光を用いることによって、細胞等の生体微粒子に対して利用できることも示されている（例えば、特公平2-91545号公報、または「ネイチャー」誌、330巻、1987年、769〜771頁等参照）。

【0011】本発明では、蛍光やラマン散乱光の3次元イメージを得るために、分光分析用のレーザー光とともに光トラップ用のレーザー光を用いる。これらのレーザー光としては、試料への損傷が少ない近赤外波長（6.0 μ mから1800nm）の波長域を持つHe-Neレーザー、半導体レーザー、Nd-YAGレーザー、Nd-YVO₄レーザー、Nd-GLASSレーザー、Nd-YLFレーザー、クリプトンレーザー、ルビーレーザー、金蒸気レーザー、アレキサンドライトレーザー、色素レーザー、チタンサファイアレーザー等を用いるが、分析スペクトルへの光トラップ用レーザー光による影響を避けるため、波長差が10nm以上（実用的には200nm以上）の2つのレーザー光を用いる。

【0012】まず、対物レンズ（または対物カセグレン鏡）により収束された光トラップ用のレーザー光を微粒子試料に照射することにより光圧力を発生させ、この光圧力によって試料を固定する。光圧力はレーザー光の強度や対物レンズの開口数等によって決まるが、走査のためには、試料を固定するのに必要な光圧力より大きな光圧力でなければならない。これは光束の焦点位置を走査（連続的に移動）させた場合、光トラップされた微粒子（試料）に対し溶液抵抗がかかるため、これを相殺するための光圧力が必要となるからである。さらに、分析用レーザー光による光トラップの影響も考慮する必要がある（これについては後で詳しく述べる。）。

【0013】光束の焦点位置を走査（移動）させる手段は水平方向と垂直方向の2つの機構からなる。まず、水平方向を走査させるためには、対物レンズに入射する平行なレーザー光をガルバノミラー（光軸を平行移動させるための光学部品）で2次的に移動させるか、または対物レンズとレーザー光の双方を光軸に対し垂直な面で2次的に移動させることによって実現できる。そして、垂直方向に走査させるためには、収束のための対物レンズを光軸方向に連続的に移動させることによって実現できる。但し、水平方向、垂直方向のいずれの場合においても、移動速度は試料への光圧力の大きさによって制限を受ける。

【0014】一方、異なる波長の分析用のレーザー光は、光トラップを防ぐためにパルスレーザー光を用いたり、光トラップ用のレーザー光より出力の小さなレーザー光を用いる、もしくは開口数の小さい対物レンズで集光する等を行う。試料からの反射光または散乱光に含まれる蛍光やラマン散乱光を再び対物レンズ（または対物カセグレン鏡）を用いてピンホールに集光される。そし

て、これらの光を分光器でスペクトルにし、検出器でその光強度を測定することにより、分子の種類を識別することができる。

【0015】本発明によれば、微粒子試料の固定に光トラップを利用することによって、直径数10ミクロン以下の微粒子試料の固定が容易となるとともに、溶液中等にある細胞等の生体試料を損傷を与えることなく固定でき、分子の種類毎の3次元イメージの取得に非常に有効である。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、本発明の内容について、発明の実施の形態に従って具体的に説明する。なお、本発明は以下の実施の形態の例のみに限定されるものではない。

【0017】

【実施の形態1】図1は本発明の第1の実施の形態を示すもので、図中、1は光トラップ用光源、2はビームエキスパンダ、3はレーザーラインフィルタ、4は反射ミラー、5はガルバノミラー、6は対物レンズ、7は調整可能マウント、8はセル、9は溶液、10は微粒子試料、11は分析用光源、12はレーザーラインフィルタ、13はビームエキスパンダ、14、15はビームスプリッタ、16は対物レンズ、17は可視光源、18は集光レンズ、19は可視透過フィルタ、20、21はビームスプリッタ、23はテレビカメラ、24は反射ミラー、25は収束レンズ、26はピンホール、27は集光レンズ、28は反射ミラー、29は調整可能マウント、30は回折格子、31は反射ミラー、32は収束レンズ、33はマルチチャネル検出器である。

【0018】光トラップ用光源1には、波長1064nm、最大出力2.5WのNd-YVO₄レーザーを用いた。レーザー光はビームエキスパンダ2を用いて適当な直径に調節し、レーザーラインフィルタ3を通過することにより他の波長成分を除いた後、反射ミラー4によりガルバノミラー5へ導入し、収束用の対物レンズ6（開口数0.8）を用いて集光した。

【0019】ガルバノミラー5を用いることにより、対物レンズ6の焦点位置を光軸に対し垂直な面内で自由に移動できる。さらに、対物レンズ6を固定する調整可能マウント7を光軸方向に移動することによって焦点位置を光軸方向へも自由に移動することができるため、結果的に焦点位置を3次的に自由に設定することが可能である。

【0020】セル8は、光透過性を有する素材（例えば、ガラス、プラスチック）からなる中空の容器であり、その内部は光透過性を有しかつ試料に応じてこれに影響を及ぼすことのない溶液（例えば、水）9が満たされ、この溶液9中に微粒子試料10がある。微粒子試料10は対物レンズ6により収束されたレーザー光によつ

で光トラップされる。光トラップされた微粒子試料 10 はレーザー光の焦点近傍に安定に固定され、レーザー光の焦点位置を変化させることによって 3 次元的に移動させることができる。なお、微粒子試料 10 を観察するための可視光学系については後述する。

【0021】一方、分析用光源 11 には、波長 730 nm、最大出力 1 W のチタンサファイアレーザーを用いた。レーザー光はビームエクスパンダ 12 を使い、適当な直径に調節し、レーザーラインフィルタ 13 を通すことにより他の波長成分を除いた後、ビームスプリット 14 で反射させ、ビームスプリット 15 を透過させた後、対物レンズ 16 (開口数 0.55) で収束して試料 10 に照射した。

【0022】試料観察のための可視光源 17 には 50 W のハロゲンランプを用いた。光源 17 からの光は集光レンズ 18 を通してから可視透過フィルタ 19 を通した後、ビームスプリット 15 で反射させ、対物レンズ 16 を用いて試料 10 に照射した。試料 10 からの反射光及び散乱光より、光トラップ用光源 1 の波長の光をホログラフィックノッチフィルタ 20 で除去し、さらに分析用光源 11 の波長の光をホログラフィックノッチフィルタ 21 で除去した後、ビームスプリット 22 によりテレビカメラ 23 に導入することによって試料を観察することができる。

【0023】また、試料の分析に用いるラマン散乱光はビームスプリット 22 を透過し、反射ミラー 24 で収束レンズ 25 に導入される。収束レンズ 25 の焦点にはピンホール 26 があり、試料の焦点外から発生したラマン散乱光が排除される。そして、このラマン散乱光は集光レンズ 27 を通り、反射ミラー 28 で調整マウント 29 に固定された回折格子 30 に照射される。

【0024】回折格子 30 でスペクトルとなった光は反射ミラー 31 で収束レンズ 32 を導入され、マルチチャネル検出器 33 に結像される。そして、マルチチャネル検出器 33 で光強度を測定することにより、分子の種類を同定したり、分子の状態を知ることができる。さらに、光トラップされている微粒子試料 10 を前記方法により 2 次元または 3 次元に連続的に走査することによって、2 次元または 3 次元のラマン散乱光のイメージを得ることができる。

【0025】測定に用いた微粒子試料 10 には、メリフィールド法によってポリローチロシンを修飾した直径約 10 μm のポリスチレンビーズを用いた。以下にその作製法の詳細を述べる。

【0026】ポリスチレンのビーズ 50 g をクロロメチルエーテル 50 ml に入れ、塩化スズ 1.8 ml を滴下する。25℃で 1 時間、さらに 0℃で 30 分攪拌する。反応液を除去し、ジオキサンと水の 3 : 1 の混合溶液で洗浄後、ジオキサンと 3 M 塩酸の 3 : 1 の混合溶液で洗浄し、水がなくなるまでジオキサンで洗い、さらにジオ

キサンがなくなるまでメタノールで洗った後、減圧下で乾燥させてクロロメチル化ポリスチレン樹脂を得た。

【0027】次に、7.2 mmol の α -トプキシルボニル (BOC) - α -トローロールアルギニンと当量のトリエチルアミンをアルコール 20 ml に溶解し、これに 10 g のクロロメチル化樹脂を加えて 80℃で 1 昼夜加熱攪拌する。樹脂をろ過してエタノール、水、メタノールの順で十分洗浄して乾燥し、 α -BOC- α -ローチロシンが表面に結合した樹脂を得た。

【0028】次に、当該樹脂に 1 M 塩酸の水酢酸溶液 30 ml を加え、室温で 30 分間ふりまぜる。溶液を除き、水酢酸、エタノール、ジメチルホルムアミド (DMF) の順で十分に洗浄する。さらに、トリエチルアミン 3 ml を DMF 30 ml に溶解した液で 20 分間洗浄し、これを除去してさらに DMF で十分に洗浄する。これにより、アルギニンの先端に結合した保護基である α -BOC 基を外した。 α -BOC- α -ローチロシン 1.76 g を精製した DMF に溶解し、これに保護基を外した当該樹脂を入れ、10 分間ふりまぜた後、ジシクロヘキシルカルボジミド (DCC) 1.32 g を DMF 3 ml に溶解して加え、2 時間ふりまぜた。

【0029】溶液を除き、DMF、エタノール、水酢酸で洗浄した後、前述と同じ方法で保護基の α -BOC 基を外した。さらに同様の方法で、 α -BOC- α -ローチロシンを反応させて保護基の α -BOC 基を外すことを 100 回繰り返して、表面がポリローチロシンで覆われたポリスチレンビーズを得た。

【0030】上記作製法によって得られたポリローチロシン修飾のポリスチレンビーズをごく少量、水中に分散させ、そのうちのビーズ 1 個に対し本装置によるラマンイメージ測定を行った。

【0031】始めに、ビーズの中心付近を通る断面で 2 次元イメージ取得測定を行った結果、ポリスチレンに含まれる一置換ベンゼン基のラマンピーク (1000 cm^{-1}) はビーズ内部に均一に分布しているのに対し、ポリローチロシンに含まれる二置換ベンゼン基のラマンピーク (826 または 850 cm^{-1}) はビーズの外周に沿って円形リング状に分布していた。

【0032】次に、同じ 2 つのラマンピークに対して 3 次元イメージ取得測定を行った結果、一置換ベンゼン基のラマンピークはビーズ内部に均一に分布しているのに対して、二置換ベンゼン基のラマンピークはビーズの外周に沿って球状に分布していた。

【0033】

【実施の形態 2】図 2 は本発明の第 2 の実施の形態を示すもので、ここでは第 1 の実施の形態において分光分析用レーザー光の焦点位置を 3 次元的に変化させるようになった例を示す。即ち、34 は分析用光源 11 のレーザー光 (ここでは可視光源からの光も含めて) の位置を光

であり、35は対物レンズ16を光軸方向に移動自在に固定する調整可能マウント35である。

【0034】これらを用いて、第1の実施の形態において光トラップ用光源1のレーザー光の焦点位置をガルバノミラー5及び調整可能マウント7により3次的に変化させると同様な手法により、分析用光源11のレーザー光の焦点位置を3次的に変化させる。この場合、光トラップされた微粒子試料10をイメージ測定中に移動させる必要はなく、ガルバノミラー5及び調整可能マウント7はなくても良い。

【0035】この装置を用いて、第1の実施の形態の場合と同様の方法で作製したポリマーレチロシン修飾のポリスチレンビーズの微粒子試料10についてラマンイメージ測定を行った。その結果、第1の実施の形態の場合と同様の結果が得られた。

【0036】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、試料の固定に非破壊・非接触の光トラップを用いることによって、直径数10ミクロン以下の小さな微粒子試料

の固定が容易となるとともに、細胞等の生体試料を損傷を与えることなく固定でき、分子の種類毎の3次元イメージの取得に非常に有効である。

【図面の簡単な説明】

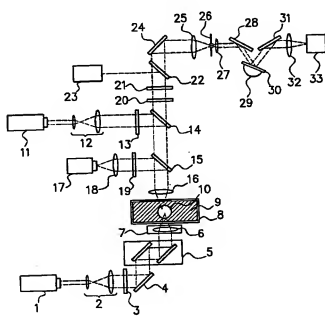
【図1】本発明の第1の実施の形態を示す装置構成図

【図2】本発明の第2の実施の形態を示す装置構成図

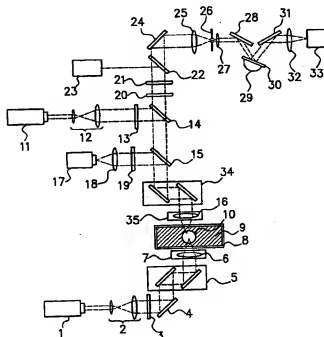
【符号の説明】

1：光トラップ用光源、2、12：ビームエキスパンダ、3、13：レーザーラインフィルタ、4、24、28、31：反射ミラー、5、34：ガルバノミラー、6、16：対物レンズ、7、35：調整可能マウント、8：セル、9：溶液、10：微粒子試料、11：分析用光源、14、15、22：ビームスプリッタ、17：可視光源、18、27：集光レンズ、19：可視透過フィルタ、20、21：ホログラフィックノッチフィルタ、23：テレビカメラ、25、32：収束レンズ、26：ピンホール、29：調整可能マウント、30：回折格子、33：マルチチャネル検出器。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

G 0 1 N 33/483

識別記号

F I

G 0 1 B 11/24

特許ト (参考)

A

(72) 発明者 鳥光 慶一

東京都千代田区大手町2丁目3番1号 日本電信電話株式会社内

Fターム(参考) 2F065 AA53 BB00 CC00 FF44 GG04
GG06 HH03 LL04 LL13 LL21
LL42 LL62 MM16 PP24 UU07
2G043 AA01 AA03 BA14 BA16 BA17
CA03 DA06 EA01 EA03 EA14
FA01 FA02 FA06 GA02 GA06
GA07 GB01 GB03 GB19 HA01
HA02 JA03 KA05 KA09 LA03
NA01 NA06
2G045 FA12 FA28 FB12 JA07
2H052 AA07 AA08 AC14 AC15 AC34
AF07